

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-148261
(43)Date of publication of application : 22.05.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/49
G09K 11/06
G01N 15/14
G01N 21/64
G01N 21/78
G01N 33/48
// G01N 33/50

(21)Application number : 2000-341309
(22)Date of filing : 09.11.2000

(71)Applicant : SYSMEX CORP
(72)Inventor : TSUJI TOMOHISA
MORI YUJIYO
SAKATA TAKASHI
HAMAGUCHI YUKIO

(54) METHOD FOR CLASSIFYING AND COUNTING ABNORMAL CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method by which white blood cells can be measured, and at the same time, abnormal cells, such as erythroblasts, large-sized platelets, hemolysis-resistant red blood cells, damaged white blood cells, aggregated platelets, etc., can be classified and counted simultaneously.

SOLUTION: In this method, abnormal cells are classified and counted, in such a way that (1) a blood sample is treated to the extent that treated red blood cells do not become obstacles to measurement and mixed with an aqueous solution composed of a red-blood cell dissolving agent, which sets white blood cells and abnormal cells to ideal states for staining and a surface active agent and (2) the mixed solution is further mixed with a stain containing at least one kind of fluorescence dye, which generates a difference in fluorescence intensity between the white blood cells and abnormal cells when the dye is stained, and a mixed solution is stained. Then (3) at least one ray of scattered light and at least one ray of fluorescence are measured, by measuring the measurement sample prepared in (2) with a flowcytometer and (4) the distributed area of the white blood cells is set by using the intensity difference between the scattered light and fluorescence measured in (3), and the white blood cells are classified and counted. In addition, (5) the distributed area of the abnormal cells is set, by using the intensity difference between the scattered light and fluorescence measured in (3) and the abnormal cells are classified and counted.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-148261
(P2002-148261A)

(43) 公開日 平成14年5月22日 (2002.5.22)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
G 0 1 N 33/49		G 0 1 N 33/49	H 2 G 0 4 3
C 0 9 K 11/06		C 0 9 K 11/06	2 G 0 4 5
G 0 1 N 15/14		G 0 1 N 15/14	C 2 G 0 5 4
21/64		21/64	F
21/78		21/78	C

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-341309(P2000-341309)

(22) 出願日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(71) 出願人 390014960

シスメックス株式会社

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

(72) 発明者 辻 智悠

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

(72) 発明者 森 悠丞

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号

シスメックス株式会社内

(74) 代理人 100088867

弁理士 西野 卓嗣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異常細胞分類計数方法

(57) 【要約】

【課題】 白血球を測定すると同時に、赤芽球、大型血小板、溶血抵抗性赤血球、ダメージ白血球、血小板凝集などの異常細胞を、同時に分類計数する方法を提供する。

【解決手段】 (1) 血液試料を、赤血球を測定の障害とならない程度に処理し、白血球と異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合し、(2) 染色することによって少なくとも白血球と異常細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色し、(2) で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定し、(4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて白血球の分布領域を設定し、白血球を分類計数し、(5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて異常細胞の分布領域を設定し、異常細胞を分類計数する。

(2)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程からなる白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法；

(1) 赤血球を測定に障害とならない程度に処理し、白血球と異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、(2) 染色することによって少なくとも白血球と異常細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、(3) (2)で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する工程、(4) (3)で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて白血球の分布領域を設定し、白血球を分類計数する工程、(5) (3)で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて異常細胞の分布領域を設定し、異常細胞を分類計数する工程。

【請求項2】 異常細胞が以下の少なくとも1つから選ばれる請求項1記載の白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法；

- (1) 血小板凝集
- (2) 大型血小板
- (3) 溶血抵抗性赤血球

* (4) ダメージ白血球

(5) 赤芽球

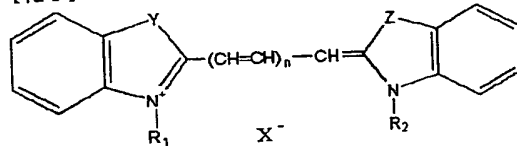
【請求項3】 白血球が以下の少なくとも1つから選ばれる請求項1記載の白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法；

(1) 好塩基球

(2) 好塩基球を除く白血球

【請求項4】 蛍光色素が、以下の群から選ばれる請求項1記載の白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法；

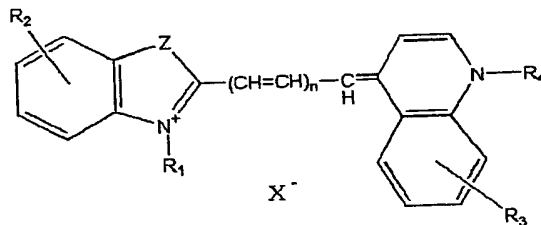
【化1】



(式中、R₁、R₂は水素原子又はアルキル基又はアルキニル基又は水酸基で置換されたアルキル基；Y、Zは硫黄又は酸素又は窒素又は低級アルキル基を有する炭素；nは0、1又は2；X⁻はアニオンである。)

20

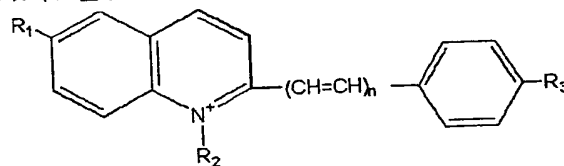
* 【化2】



(式中、R₁は水素原子又はアルキル基；R₂およびR₃は水素原子、低級アルキル基又は低級アルコキシ基；R₄は水素原子、アシル基又はアルキル基；Zは硫黄、酸 ※

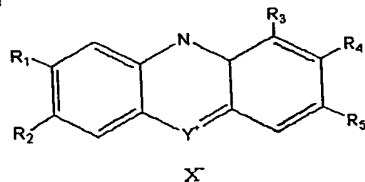
※素、あるいは低級アルキル基を有する炭素；nは0、1又は2；X⁻はアニオンである。)

【化3】



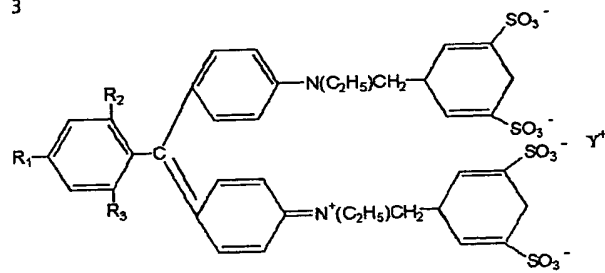
(式中、R₁は水素原子又はジメチルアミノ基；R₂はアルキル基、R₃は水素原子又はジメチルアミノ基；nは1又は2；X⁻はアニオンである。)

【化4】

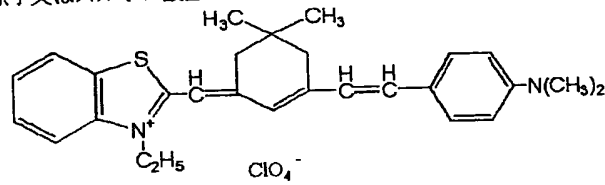
X⁻

40 (式中、R₁は水素原子又はアルキル基；R₂はジメチルアミノ基；R₃は水素原子又はアミノ基；R₄は水素原子又はアルキル基又はアミノ基；R₅は水素原子又はジメチルアミノ基；X⁻はアニオン；Yは硫黄又は酸素である。)

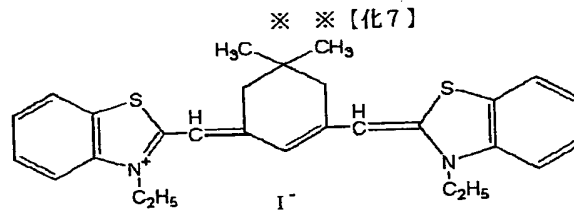
【化5】



(式中、 R_1 は水素原子又は水酸基； R_2 は水素原子又は 10* アルカリ金属イオンである。) スルホン酸基； R_3 は水素原子又はスルホン酸基； Y^+ は* 【化6】

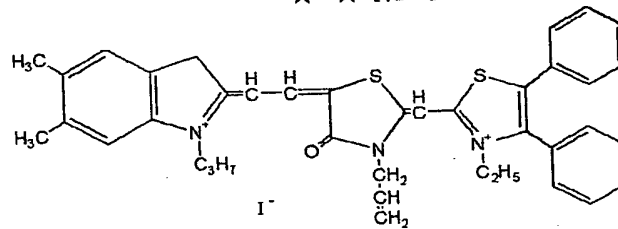
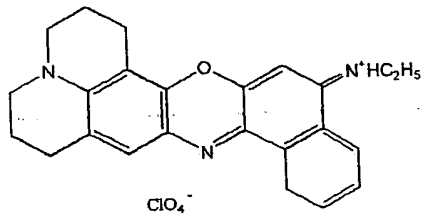
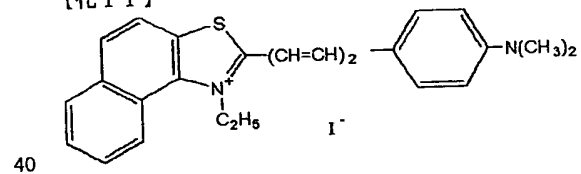
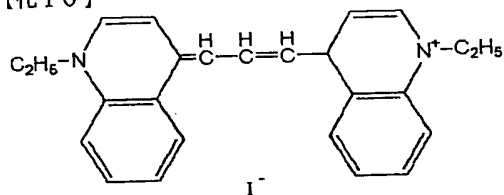


NK-2825



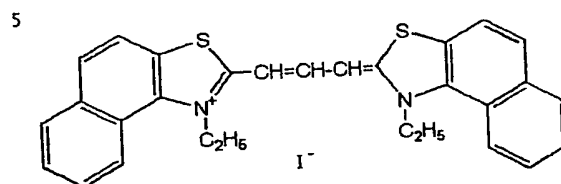
NK-1836

★ ★ 【化8】

NK-1954
【化9】Cryptocyanine
【化11】NK-376
【化12】Oxazine750
【化10】

(4)

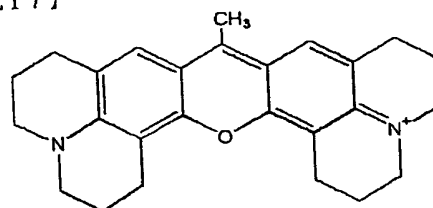
6



* LDS730

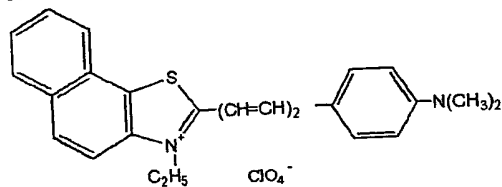
【化17】

10



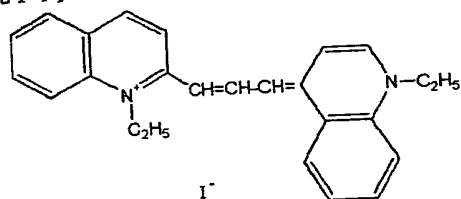
NK-382

【化13】



NK-2711

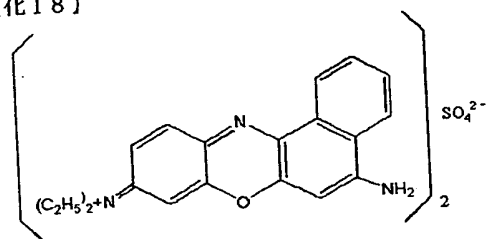
【化14】



LD700

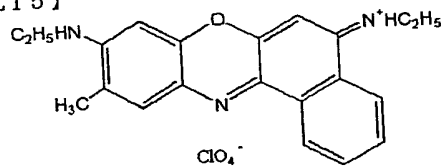
【化18】

20



NK-138

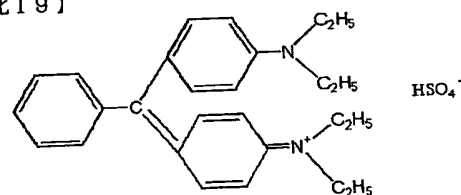
【化15】



Nile Blue A

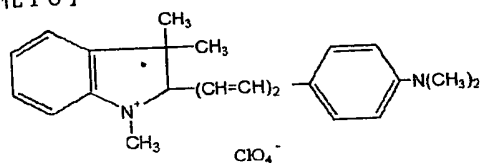
【化19】

30



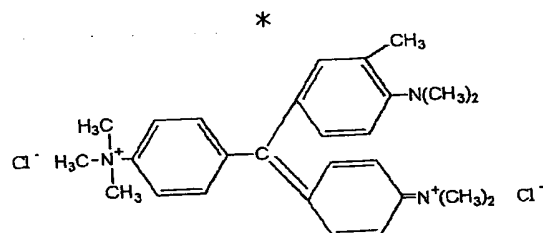
Oxazine720

【化16】



Brilliant Green

【化20】

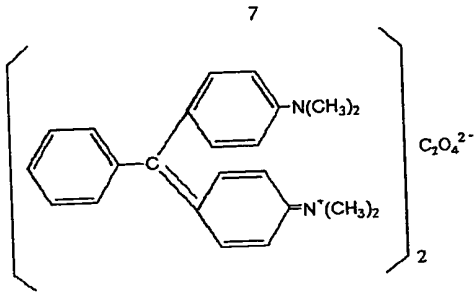


Iodide green

【化21】

(5)

8

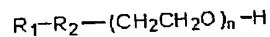
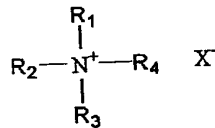


Malachite green

【請求項5】 赤血球溶解剤が浸透圧100mOsm/kg以下のpH2.0～5.0の水溶液である請求項1記載の白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法。

【請求項6】 界面活性剤が、以下の群から選ばれる請求項1記載の白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法。

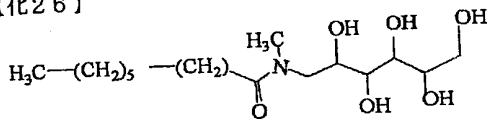
【化22】



(式中、R1はC9-25のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；

R2は または-COO-；nは10～40である。)

【化26】

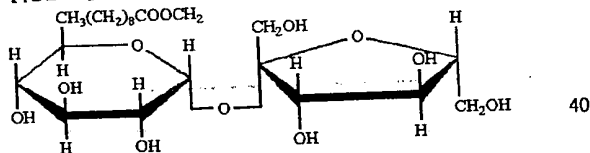


30※シュクロースモノカプレート

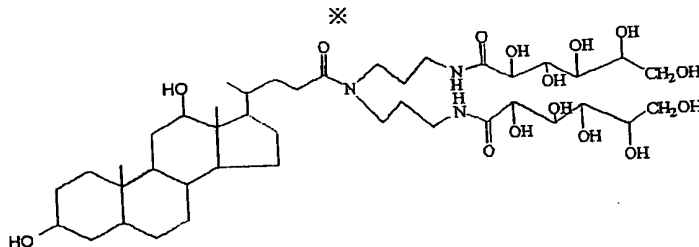
【化28】

MEGA-8

【化27】



※

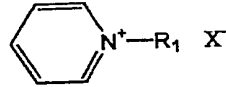


Deoxy-BIGCHAP

50 【化29】

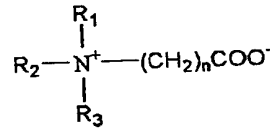
* (式中、R₁、R₂及びR₃は同一又は異なって、H原子、C₁₋₈アルキル基又はC₆₋₈のアラルキル基；R₄はC₈₋₁₈のアルキル基、C₆₋₁₈のアルケニル基又はC₆₋₁₈のアラルキル基；X⁻はアニオンである。)

【化23】



10 (式中、R₁はC₈₋₁₈のアルキル基；X⁻はアニオンである。)

【化24】

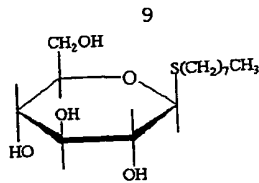


(式中、R₁、R₂は同一又は異なって、H原子、C₁₋₈のアルキル基又はC₆₋₈のアラルキル基；R₃はC₈₋₁₈のアルキル基、C₈₋₁₈のアルケニル基又はC₆₋₁₈のアラルキル基；nは1又は2である。)

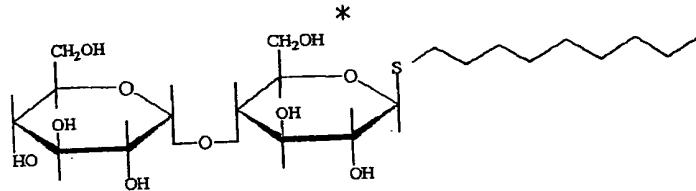
20

【化25】

*

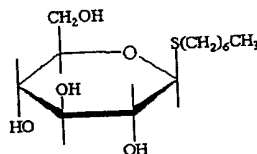


* n-オクチル-β-D-チオグルコシド
【化30】

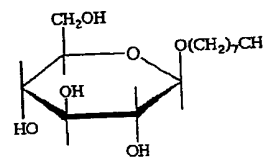


※【化32】

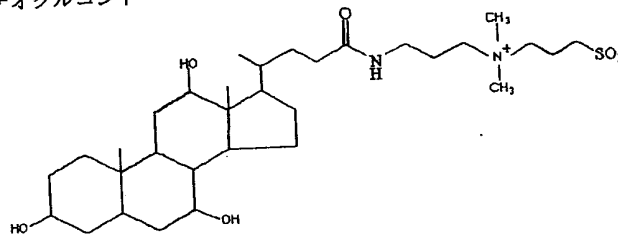
n-ノニル-β-D-チオマルトシド
【化31】



n-ヘプチル-β-D-チオグルコシド

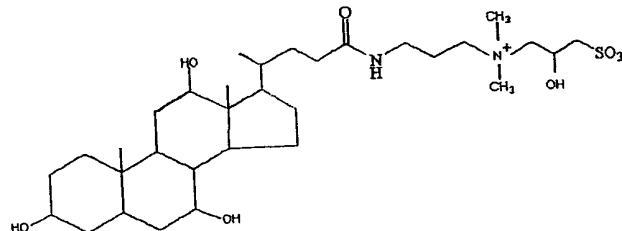


20 n-オクチル-β-D-チオグルコシド
※【化33】



CHAPS

★30★【化34】



CHAPSO

【請求項7】 界面活性剤濃度が10~10000mg / 1である請求項1記載の白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法。

【請求項8】 以下の工程からなる白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法；

(1) 赤血球を測定障害とならない程度に処理し、白血球と異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、(2) 染色することによって少なくとも白血球と異常細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、(3) (2) で調製

した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する工程、(4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて好塩基球を除く白血球の分布領域を設定し、好塩基球を除く白血球を分類計数する工程、(5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて血小板凝集の分布領域を設定し、血小板凝集を分類計数する工程、(6) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて大型血小板の分布領域を設定し、大型血小板を分類計数する工程、(7) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて溶血抵抗性赤血球の分布領域を設定し、溶血抵抗性赤血球を分類計数する工程、(8) (3) で測定

した散乱光と蛍光の強度差を用いてダメージ白血球の分布領域を設定し、ダメージ白血球を分類計数する工程、

(9) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球の分布領域を設定し、赤芽球を分類計数する工程、(10) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球を成熟度ごとに少なくとも2つに分類計数する工程、(11) (4) で分類計数した白血球と、

(9) で分類計数した赤芽球より、白血球に対する赤芽球の割合を算出する工程、(12) (9) で分類計数した赤芽球数と、(10) で成熟度ごとに少なくとも2つに分類計数した赤芽球数から全赤芽球に対する成熟度ごとの赤芽球に対する割合を算出する工程、(13)

(3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて好塩基球の分布領域を設定し、好塩基球を分類計数する工程。

【請求項9】 測定する散乱光が、前方低角散乱光、前方高角散乱光及び側方散乱光から選ばれる少なくとも1つである請求項1～8記載の異常細胞分類計数方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はフローサイトメトリによる異常細胞の分類計数に関する。

【0002】

【従来の技術】 臨床検査の分野において、赤芽球、大型血小板などを測定することは、疾患の診断、予後診断を行う上で極めて有用な情報を得ることができる。通常、赤芽球は骨髓中に存在し、末梢血中には存在しない。そのため末梢血への赤芽球の出現は、急性骨髓性白血病、溶血性貧血、鉄欠乏性貧血、悪性貧血、サラセミアなどの疾患が存在する可能性を示している。大型血小板の出現については、ITPなどの疾患が存在する可能性を示している。溶血抵抗性赤血球、血小板凝集についても、造血器疾患が存在する可能性を示している。また、ダメージ白血球は、採血後時間が経過した、保存状態が悪い、薬物投与などの影響がある可能性を示している。

【0003】 近年、フローサイトメータの原理を応用した種々の全自動白血球分類計数装置が提供されている。しかしながら、これらの装置は、赤芽球、大型血小板、溶血抵抗性赤血球、ダメージ白血球、血小板凝集などを同時に1つの測定チャンネルで測定することはできず、複数の測定チャンネルを用いて検出していた。また複数の試薬を使用する必要があり、この場合ランニングコストが高くなるという問題がある。

【0004】 さらに、全てのチャンネルが、検体測定時にすべて使用されるわけではなく、ディスクリートされて行われることが多い。このような場合、一つの測定法では、異常細胞に対する十分な検知力を得ることができず、異常細胞を見落とすことがある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、白血球を測定すると同時に、赤芽球、大型血小板、溶血抵抗性赤血

球、ダメージ白血球、血小板凝集などの異常細胞を、同時に分類計数する方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、以下の工程：

(1) 赤血球を測定の障害とならない程度に処理し、白血球と異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、(2) 染色することによって少なくとも白血球と異常細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、(3) (2) で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する工程、(4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて白血球の分布領域を設定し、白血球を分類計数する工程、(5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて異常細胞の分布領域を設定し、異常細胞を分類計数する工程、からなる異常細胞分類計数方法を提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】 本発明でいう血液試料は、末梢血液、臍帯血、骨髓液、尿、アフエーシスで採取した血液試料などの体液試料をいう。

【0008】 溶血抵抗性赤血球とは、一般的に知られる溶血法などでは、溶解されない赤血球のことをいう。

【0009】 ダメージ白血球とは、採血後時間が経過した、または保存状態が悪く、細胞膜に損傷を受けた白血球のことをいう。

【0010】 本発明ではまず、血液試料を、白血球並びに異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤からなる溶血剤と混合し、血液試料中の赤血球を測定の障害とならない程度に溶解する。このために好適な溶解剤とは、赤血球を溶解するが、白血球細胞へのダメージの少ない溶解剤であり、例えば、浸透圧100 mOsm/kg以下、pH2.0～5.0の水溶液である。

【0011】 本工程の目的は、異常細胞と白血球を測定する上で障害となる赤血球を溶血すること、異常細胞と白血球の間に蛍光強度の差異を生じさせることである。

【0012】 赤血球は、若干の個体差があるが、通常150 mOsm/kg以下の浸透圧で細胞膜に細孔を生じ、細胞内部のヘモグロビンを流出し、光学的に透明となる(溶血する)。光学的に透明となった赤血球は、測定の障害とはならなくなる。赤血球の溶血は浸透圧の低いほど、pHの低いほど速やかに進行する。本発明で使用する溶血剤では、個体差考慮して100 mOsm/kg以下の浸透圧を使用する。この浸透圧を達成するためには、例えば、NaCl、KClなどの電解質、糖類又は後述の緩衝剤濃度などにより浸透圧を調整することができる。

【0013】 pHが低すぎる場合、赤血球のみならず、

白血球、赤芽球などの異常細胞にも過度の障害を与えるため、後述する蛍光強度の差異が得にくくなる。

【0014】溶血のpHは、赤血球の溶血が効率よく行われるために、酸性側にすることが好適である。特に好適には、2.0～5.0のpHが使用される。さらに好適には、2.5～4.5のpHが選ばれる。

【0015】また、pHを一定に保つためには、緩衝剤を使用することが好適であり、設定するpH±2.0の付近にpKaを有する緩衝剤が使用できる。例えば、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、ジグリコール酸、マロ

ン酸などの緩衝剤を含むことができる。
【0016】さらに、溶血剤中に少なくとも1つの、分子内に少なくとも1つの芳香環を有する有機酸もしくはその塩を使用することにより、より効果的に（短時間に）赤血球を溶血することができる。好ましい有機酸もしくはその塩としては、例えばサリチル酸、サリチル酸ナトリウム、フタル酸などが挙げられる。これらは、緩衝剤としても作用する。

【0017】本条件下では、赤芽球の細胞膜も赤血球と同様に細孔を生じ溶血するが、赤芽球の細胞核の性状は、ほぼ生きた細胞と同様に保たれる。

【0018】一方、白血球の細胞膜への傷害は明確ではないが、光学的顕微鏡による観察では、生細胞と顕著な差は認められない。

【0019】本発明では、界面活性剤を含むが、界面活性剤は、難溶性の色素の可溶性、赤血球ゴーストの凝集防止、赤血球ゴースト収縮、赤血球溶血促進の目的で使用される。

【0020】しかし、界面活性剤の濃度が高すぎる場合、赤血球のみならず、白血球、赤芽球などにも過度の傷害を与え、特に赤芽球の形状を変化させ、後述する赤*

*芽球と白血球の蛍光強度の差異を小さくする問題がある。

【0021】従って、本発明に使用する界面活性剤は、赤芽球を含む異常細胞と白血球の蛍光強度の差異を小さくするように濃度の調整を行った。

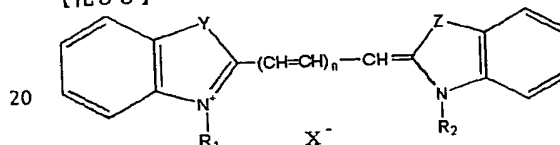
【0022】界面活性剤濃度は、10～10000mg/lにすることが好適である。さらに好適には、100～5000mg/lの濃度が選ばれる。

【0023】この結果、予期せぬことに、従来不可能であったと考えられてきた、異常細胞と白血球の間の明瞭な蛍光強度の差異を生じさせ、さらに赤芽球を成熟度ごとに分類計数することが可能になった。

【0024】少なくとも白血球と異常細胞の間に蛍光強度の差異を生じる蛍光色素とは、以下の群からなる色素のうち少なくとも1種類が使用される。

【0025】

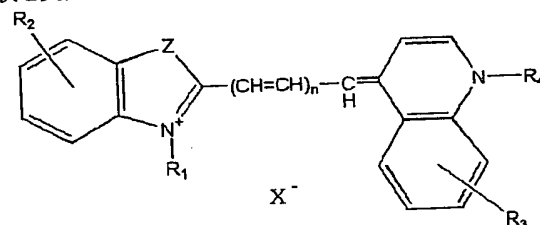
【化35】



【0026】（式中、R₁、R₂は水素原子又はアルキル基又はアルキニル基又は水酸基で置換されたアルキル基；Y、Zは硫黄又は酸素又は窒素又は低級アルキル基を有する炭素；nは0、1又は2；X⁻はアニオンである。）

【0027】

【化36】

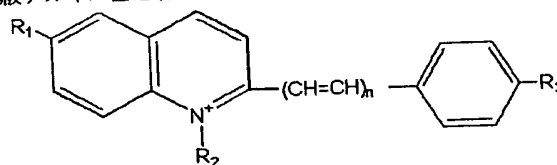


【0028】（式中、R₁は水素原子又はアルキル基；R₂およびR₃は水素原子、低級アルキル基又は低級アルコキシ基；R₄は水素原子、アシル基又はアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは低級アルキル基を有する炭素；nは0、1又は2；X⁻はアニオンである。）

40※素；nは0、1又は2；X⁻はアニオンである。）

【0029】

【化37】

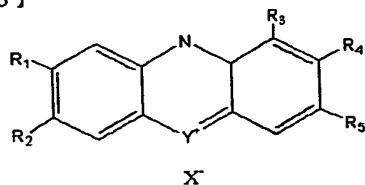


【0030】（式中、R₁は水素原子又はジメチルアミノ基；R₂はアルキル基、R₃は水素原子又はジメチルア

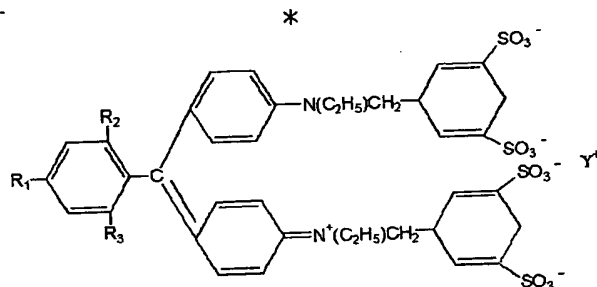
(9)

16

15
ミノ基；nは1又は2；X⁻はアニオンである。）
【0031】
【化38】

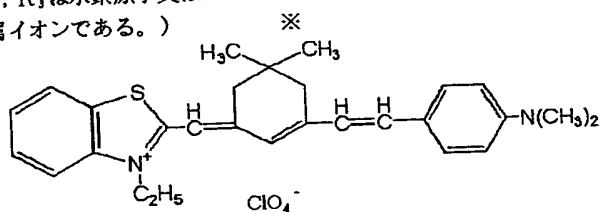


*【0032】（式中、R₁は水素原子又はアルキル基；
R₂はジメチルアミノ基；R₃は水素原子又はアミノ基；
R₄は水素原子又はアルキル基又はアミノ基；R₅は水素
原子又はジメチルアミノ基；X⁻はアニオン；Yは硫黄
又は酸素である。）
【0033】
【化39】



【0034】（式中、R₁は水素原子又は水酸基；R₂は
水素原子又はスルホン酸基；R₃は水素原子又はスルホ
ン酸基；Y⁺はアルカリ金属イオンである。）

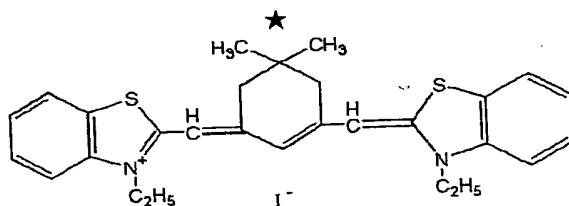
※【0035】
20 【化40】



NK-2825

【0036】

★【化41】

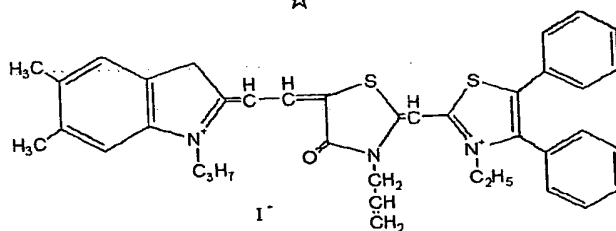


NK-1836

【0037】

☆【化42】

☆



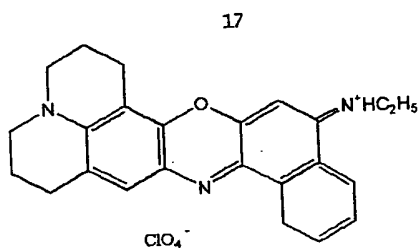
NK-1954

【0038】

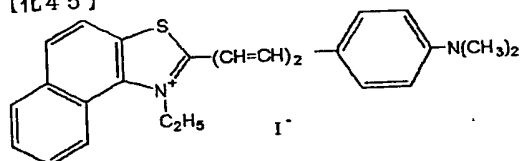
【化43】

(10)

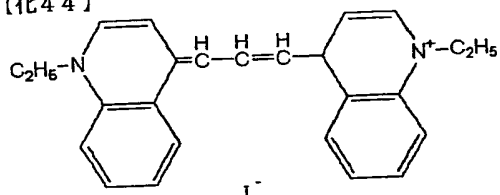
18



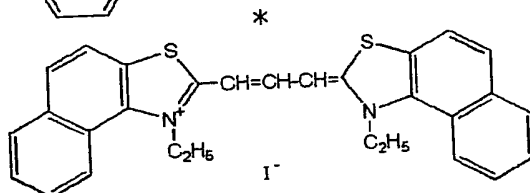
* Cryptocyanine
[0040]
[化45]



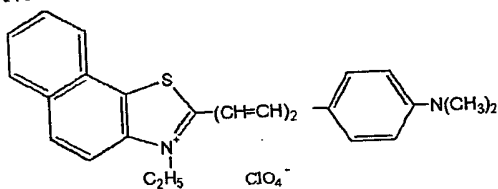
Oxazine750
[0039]
[化44]



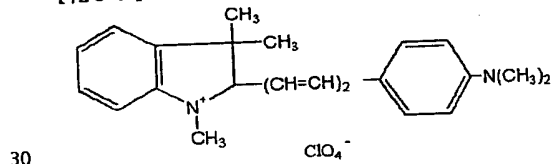
10 NK-376
[0041]
[化46]



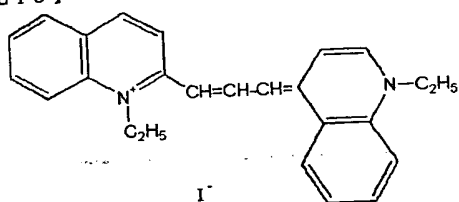
NK-382
[0042]
[化47]



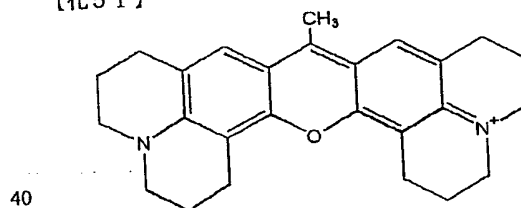
Oxazine720
[0045]
[化50]



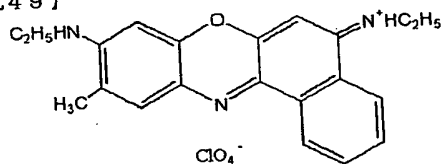
NK-2711
[0043]
[化48]



LDS730
[0046]
[化51]



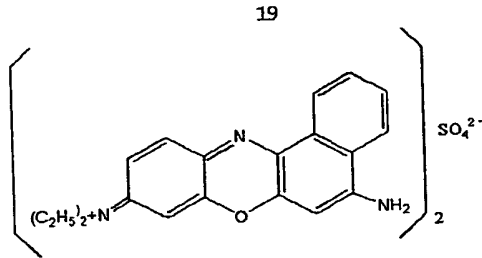
NK-138
[0044]
[化49]



LD700
[0047]
[化52]

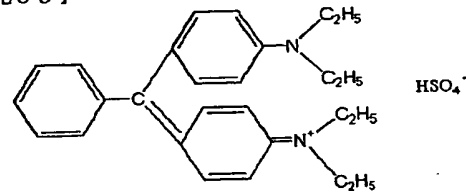
(11)

20



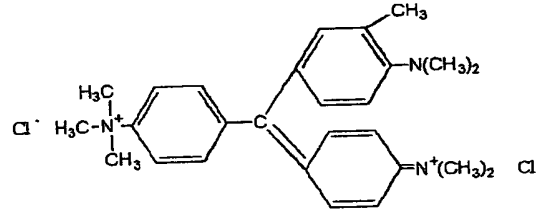
Nile Blue A
【0048】

*【化53】

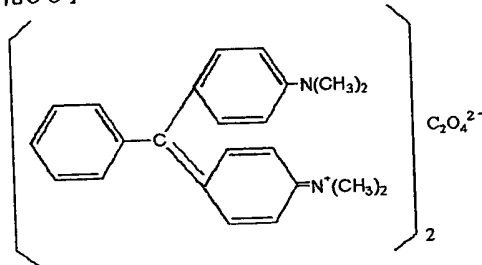


Brilliant Green
【0049】

*10 【化54】



Iodide green
【0050】
【化55】



Malachite green

【0051】式中、ヘテロ環の窒素原子又は炭素原子に結合するアルキル基は、炭素数1-20、好ましくは、1-10、より好ましくは炭素数1-6のアルキル基であり、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシルなどを挙げることができる。

【0052】低級アルキル基又は低級アルコキシ基とは炭素数1-8の直鎖又は分岐アルキル基又はアルコキシ基であり、好ましくはメチル、エチル、メトキシ、エトキシである。アシル基としては炭素数1-3のもの、例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニルが好ましい。好ましいアニオンには、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- などのハロゲンイオン、及び CF_3^- 、 SO_3^- 、 BF_4^- 、 ClO_4^- などを含む。

【0053】上記に記載した色素のうちNKシリーズは、日本感光色素研究所(株)より、LDS730、LD700はExciton社より、その他のものは市販品を購入することができる。

【0054】蛍光色素は、溶血剤に溶解させ、溶血剤と同時に血液に作用させても(混合させても)良いし、溶解処理(工程の)後、適当な溶媒(水、低級アルコー

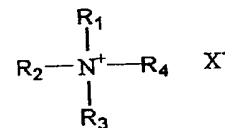
ル、エチレングリコール、DMSO、等)に溶解したものもを添加しても良い。色素の濃度は使用する色素により異なるが、一般に0.01~100mg/l、好ましくは0.1~10mg/l、より好ましくは0.3~3.0mg/lである。なお、この濃度は溶血剤と色素溶液を混合した状態での濃度である。

【0055】前述の溶血剤で処理した血球を上述の色素で染色した場合、白血球は強く染色され、フローサイトメータで測定した場合強い蛍光を発する。一方、赤芽球は弱く染色され、弱い蛍光を発する。白血球と赤芽球の蛍光強度に差異が生じる作用機序は明確ではないが、おそらく赤芽球の核(DNA)が凝縮しているために、色素の細胞核への取り込みが阻害されていると考えられる。

【0056】本発明で使用される界面活性剤としては、以下の群から少なくとも1種類が好適に使用される。

【0057】

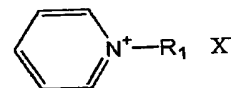
【化56】



【0058】(式中、 R_1 、 R_2 及び R_3 は同一又は異なって、H原子、 C_{1-6} アルキル基又は C_{6-10} のアラルキル基； R_4 は C_{6-10} のアルキル基、 C_{6-10} のアルケニル基又は C_{6-10} のアラルキル基； X^- はアニオンである。)

【0059】

【化57】



(12)

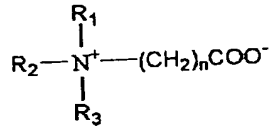
特開2002-148261

21

【0060】(式中、 R_1 は C_{1-18} のアルキル基； X^- はアニオンである。)

【0061】

【化58】



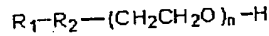
22

* 【0062】(式中、 R_1 、 R_2 は同一又は異なって、H原子、 C_{1-8} のアルキル基又は C_{6-8} のアラルキル基； R_3 は C_{1-18} のアルキル基、 C_{6-18} のアルケニル基又は C_{6-18} のアラルキル基； n は1又は2である。)

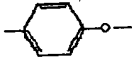
【0063】

【化59】

*

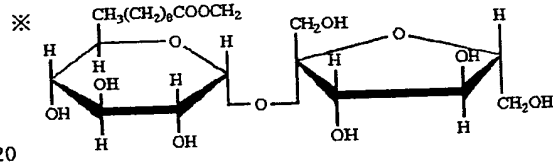
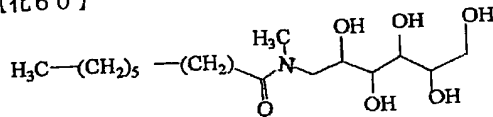


(式中、 R_1 は C_9-25 のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；

R_2 は  または $-COO-$ ； n は10~40である。)

【0064】

【化60】



20

MEGA-8

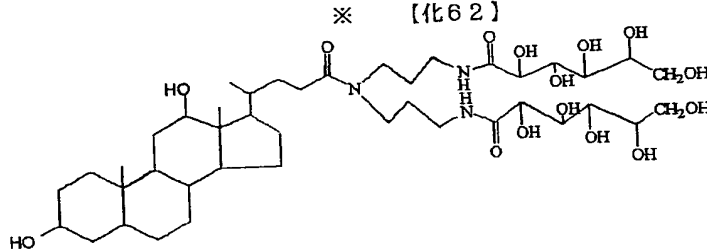
【0065】

【化61】

シュクロースモノカプレート

【0066】

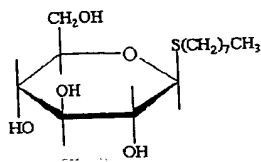
【化62】



Deoxy-BIGCHAP

【0067】

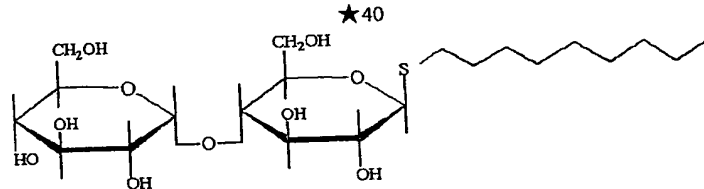
【化63】



★ n-オクチル-β-D-チオグルコシド

【0068】

【化64】

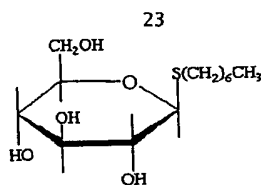


n-ノニル-β-D-チオマルトシド

【0069】

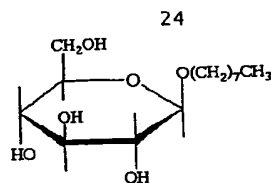
【化65】

(13)

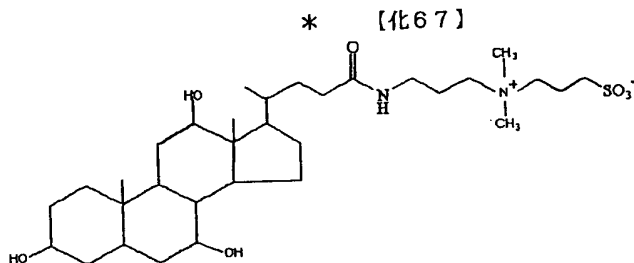


n-ヘプチル-β-D-チオグルコシド
【0070】
【化66】

*

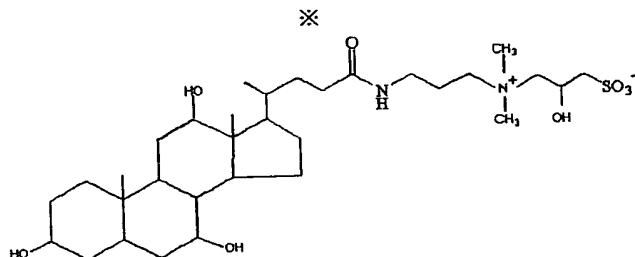


n-オクチル-β-D-チオグルコシド
【0071】
【化67】



CHAPS
【0072】

※【化68】



CHAPSO

【0073】上記の式中、C₁₋₈のアルキル基又はC₆₋₈のアラルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ベンジルなどを挙げることができる。好ましくは、メチル、エチルなどのC₁₋₃のアルキル基である。

【0074】C₆₋₁₁のアルキル基、C₆₋₁₁のアルケニル基又はC₆₋₁₁のアラルキル基としては、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシル、オレイルなどを挙げることができる。好ましくはデシル、ドデシル、テトラデシルなどのC₁₀₋₁₁の直鎖のアルキル基である。

【0075】C₆₋₁₁のアルキル基としては、デシル、ドデシル、テトラデシルなどのC₁₀₋₁₁の直鎖のアルキル基を挙げることができる。

【0076】また、C₉₋₂₅のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基の例としては、ノニル、ドデシル、ヘキサデシル、オレイル等が挙げられる。

【0077】上記に記載した界面活性剤のうち、MEGA-8からCHAPSOまでは株式会社 同仁化学研究所より購入することができる。

【0078】界面活性剤の濃度は、界面活性剤の種類により好適な濃度が異なるが、10~10000mg/l、好ましくは100~5000mg/l、さらには好

ましくは1000~3000mg/lである。なお、この濃度は溶血剤に含まれる界面活性剤の濃度である。

【0079】本発明の好ましい態様では、サリチル酸などの有機酸、色素、及び界面活性剤を精製水に溶解し、NaOH、HClなどを用いてpHを調整して得られる簡単な組成の試薬を用いることができる。試薬と試料を混合し、15~50℃、好ましくは20~40℃で、3~120秒間、好ましくは5~40秒間反応させる。

【0080】このようにして調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する。

【0081】本発明でいう散乱光は、一般に市販されるフローサイトメータで測定できる散乱光をさし、前方低角散乱光(受光角度の例として、0~5度未満)、前方高角散乱光(受光角度の例として、5~20度付近)、側方散乱光(受光角度は90度付近)等をいい、好ましくは、前方低角散乱光が選ばれ、この散乱光は白血球の大きさ情報を反映する。

【0082】蛍光とは、前述の細胞成分と色素から発せられるもので、使用する色素によって好適な受光波長が選択される。蛍光信号は、細胞化学的特性を反映するものである。

【0083】フローサイトメータの光源は、特に限定さ

30

40

50

れず、色素の励起に好適な波長の光源が選ばれる。例えば、アルゴンイオンレーザ、He-Neレーザ、赤色半導体レーザ、青色半導体レーザなどが使用される。特に半導体レーザは気体レーザに比べ非常に安価であり、装置コストを大幅に下げることができる。

【0084】次いで、測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球系細胞を分類計数し、赤芽球系細胞を成熟度ごとに分類計数する。「測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて、赤芽球系細胞を分類計数する工程」とは、例えば、X軸に蛍光、Y軸に前方低角散乱光をとってスキャッタグラムを描いた場合、例えば図1に示すように、赤芽球(NRBC)、白血球(WBC)及びゴースト化した細胞(Ghost)の各細胞は、集団(クラスター)を形成して分布する。そしてこの集団を、適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域に含まれる細胞数を解析することにより、赤芽球の数と割合を計算する工程をいう。「赤芽球を成熟度で分類計数する工程」とは、例えば、X軸に蛍光、Y軸に前方低角散乱光をとってスキャッタグラムを描いた場合、例えば図1に示すように、赤芽球は成熟度によって集団(クラスター)を形成して分布する。Stage I領域は、最も幼若な赤芽球である前赤芽球と好塩基性赤芽球が分布し、Stage*

サリチル酸(市販品)

NK-2825(日本感光色素研究所(株))

ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド(市販品)

精製水

NaOHでpHを3.0に調製(浸透圧 40mOsm/kg)

上記試薬1.0mlに抗凝固剤処理した赤芽球が末梢血に出現した患者の血液を30μlを加え、40℃で5秒間反応させた後、フローサイトメータで、前方低角散乱光、蛍光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。蛍光は660nm以上の波長の蛍光を測定した。

【0088】図2にX軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光をとったスキャッタグラムを示す。血球は、白血球、赤芽球StageI、赤芽球StageII、赤芽球StageIIIの4つの集団を形成する。

【0089】上記の血液にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った。赤芽球を前赤芽球、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球に分類し、上記フローサイトメータで得られた結果と比較した。

【0090】図3にフローサイトメータと目視の結果を示す。図3より、本発明と目視の結果がよく一致していることが判明した。

【0091】実施例2 赤芽球及び溶血抵抗性赤血球出現例

メイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った結果、脱核直前の赤芽球が認められ、市販の血球計数器で溶血抵抗性と判定された抗凝固剤処理した患

*e II領域は、多染性赤芽球、StageIII領域は、最も成熟した正染性赤芽球が分布している。また、Stage IV領域は、脱核直線の赤芽球が分布している。そしてこの集団を適当な解析ソフトを用いて各集団の領域を設定し、その領域に含まれる細胞数を解析することにより、赤芽球の各成熟度での数と割合を算出する工程をいう。

【0085】また、「測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて、血小板凝集を分類計数する工程」とは、例えば、X軸に蛍光、Y軸に前方低角散乱光をとってスキャッタグラムを描いた場合、例えば図1に示すように、血小板凝集は、集団(クラスター)を形成して分布する。そしてこの集団を、適当な解析ソフトを用いて領域を設定し、その領域に含まれる細胞数を計数することにより、血小板凝集の数と割合を算出する工程をいう。

【0086】本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明には種々の変更、修飾が可能であり、従って、本発明の範囲は以下の実施例によって限定されるものではない。

【0087】

【実施例】実施例1 赤芽球出現例

以下の組成の試薬を調製した。

10mM

0.3mg/l

0.3g/l

11

者の血液30μlに実施例1の試薬1.0mlを加え、40℃で5秒間反応させた後、フローサイトメータで、前方低角散乱光、蛍光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。蛍光は660nm以上の波長の蛍光を測定した。

【0092】図4にX軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光をとったスキャッタグラムを示す。血球は、白血球、脱核直前の赤芽球、溶血抵抗性赤血球の3つの集団を形成する。図4より、本発明により脱核直前の赤芽球、溶血抵抗性赤血球が測定できることが判明した。

【0093】実施例3 血小板凝集出現例

メイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った結果、血小板凝集が認められた抗凝固剤処理した患者の血液30μlに実施例1の試薬1.0mlを加え、40℃で5秒間反応させた後、フローサイトメータで、前方低角散乱光、蛍光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。蛍光は660nm以上の波長の蛍光を測定した。

【0094】図5にX軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光をとったスキャッタグラムを示す。血球は、白血球、血小板凝集の2つの集団を形成する。図5より、本発明により血小板凝集が測定できることが判明した。

【0095】実施例4 大型血小板出現例

メイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った結果、大型血小板が認められた抗凝固剤処理した患者の血液30 μ lに実施例1の試薬1.0mlを加え、40 $^{\circ}$ Cで5秒間反応させた後、フローサイトメータで、前方低角散乱光、蛍光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。蛍光は660nm以上の波長の蛍光を測定した。

【0096】図6にX軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光をとったスキッタグラムを示す。血球は、白血球、大型血小板の2つの集団を形成する。図6より、本発明により大型血小板が測定できることが判明した。

【0097】実施例5 好塩基球出現例

実施例1の試薬1.0mlに抗凝固剤処理した好塩基球が末梢血に出現した患者の血液を30 μ lを加え、40 $^{\circ}$ Cで5秒間反応させた後、フローサイトメータで、前方低角散乱光、蛍光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。蛍光は660nm以上の波長の蛍光を測定した。

【0098】図7にX軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光をとったスキッタグラムを示す。血球は、好塩基球、好塩基球以外の白血球の2つの集団を形成する。

【0099】上記の血液にメイグリュンワルド染色を施した後、顕微鏡により目視を行った。白血球を好塩基球、好塩基球以外の白血球に分類し、上記フローサイトメータで得られた結果と比較した。図8にフローサイトメータと目視の結果を示す。図8より、本発明と目視の結果がよく一致していることが判明した。

【0100】実施例6 ダメージ白血球出現例

実施例1の試薬1.0mlに抗凝固剤処理し、採血後48時間経過した末梢血を30 μ lを加え、40 $^{\circ}$ Cで5秒間反応させた後、フローサイトメータで、前方低角散乱*

光、蛍光を測定した。光源は633nmの赤色半導体レーザを使用した。蛍光は660nm以上の波長の蛍光を測定した。

【0101】図9にX軸に赤蛍光強度、Y軸に前方低角散乱光をとったスキッタグラムを示す。血球は、ダメージ白血球、それ以外の白血球の2つの集団を形成する。

【0102】

【発明の効果】本発明によれば、白血球を測定すると同時に、赤芽球、大型血小板、溶血抵抗性赤血球、ダメージ白血球、血小板凝集などの異常細胞を、同時に分類計数することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法によって得られるスキッタグラムの模式図である。

【図2】本発明の実施例1によって得られるスキッタグラムである。

【図3】本発明の実施例1において本発明と目視の結果を比較した図である。

【図4】本発明の実施例2によって得られるスキッタグラムである。

【図5】本発明の実施例3によって得られるスキッタグラムである。

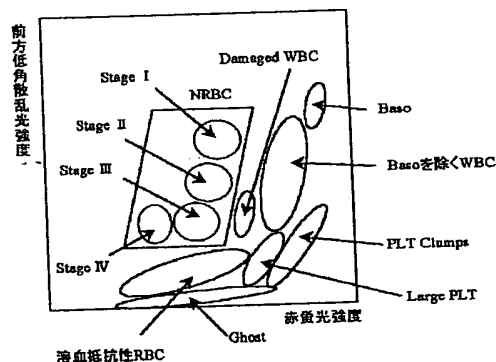
【図6】本発明の実施例4によって得られるスキッタグラムである。

【図7】本発明の実施例5によって得られるスキッタグラムである。

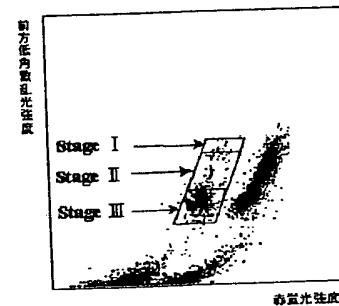
【図8】本発明の実施例5において本発明と目視の結果を比較した図である。

【図9】本発明の実施例6によって得られるスキッタグラムである。

【図1】



【図2】



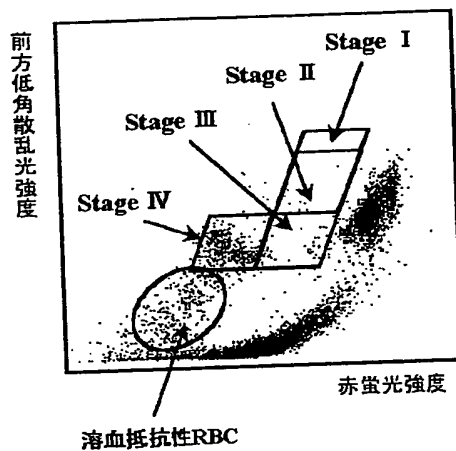
【図3】

本発明		目視法	
Stage I	0.7%	前赤芽球+好塩基性赤芽球	0%
Stage II	17.6%	多葉性赤芽球	18%
Stage III	81.7%	正葉性赤芽球	82%

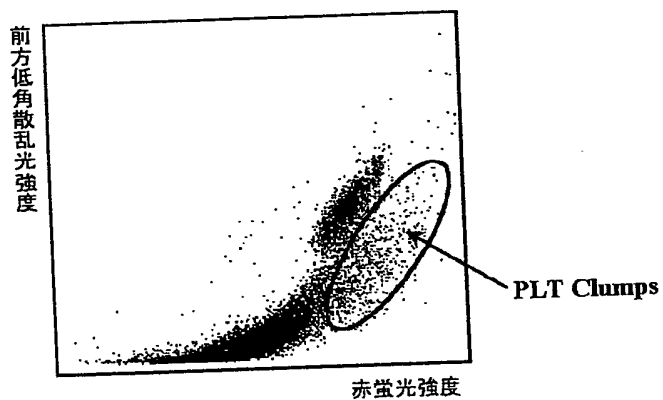
【図8】

	本発明	目視法
好塩基球	7.0%	8.5%
好塩基球以外の白血球	93.0%	91.5%

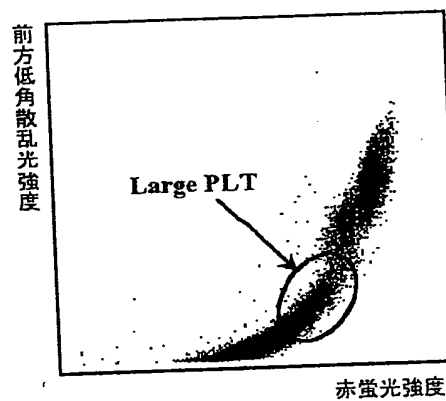
【図4】



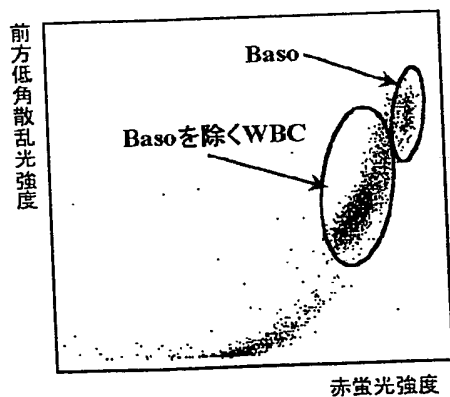
【図5】



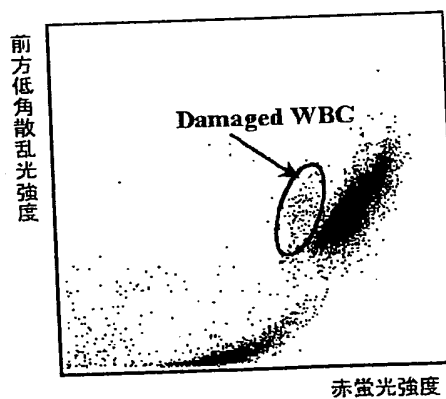
【図6】



【図7】



【図9】



【手続補正書】

【提出日】平成12年11月9日(2000.11.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項1】 以下の工程からなる白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法；

(1) 血液試料を、赤血球を測定の際としない程度に処理し、白血球と異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、(2) 染色することによって少なくとも白血球と異常細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、(3)

(2) で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する工程、(4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて白血球の分布領域を設定し、白血球を分類計数する工程、(5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて異常細胞の分布領域を設定し、異常細胞を分類計数する工程。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項8

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項8】 以下の工程からなる白血球と少なくとも1つの異常細胞を分類計数する方法；

(1) 血液試料を、赤血球を測定の際としない程度に処理し、白血球と異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、(2) 染色することによって少なくとも白血球と異常細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、(3)

(2) で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する工程、(4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて好塩基球を除く白血球の分布領域を設定し、好塩基球を除く白血球を分類計数する工程、

(5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて血小板凝集の分布領域を設定し、血小板凝集を分類計数*

*する工程、(6) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて大型血小板の分布領域を設定し、大型血小板を分類計数する工程、(7) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて溶血抵抗性赤血球の分布領域を設定し、溶血抵抗性赤血球を分類計数する工程、(8)

(3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いてダメージ白血球の分布領域を設定し、ダメージ白血球を分類計数する工程、(9) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球の分布領域を設定し、赤芽球を分類計数する工程、(10) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて赤芽球を成熟度ごとに少なくとも2つに分類計数する工程、(11) (4) で分類計数した白血球と、(9) で分類計数した赤芽球より、白血球に対する赤芽球の割合を算出する工程、(12) (9) で分類計数した赤芽球数と、(10) で成熟度ごとに少なくとも2つに分類計数した赤芽球数から全赤芽球に対する成熟度ごとの赤芽球に対する割合を算出する工程、(13) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて好塩基球の分布領域を設定し、好塩基球を分類計数する工程。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、以下の工程：

(1) 血液試料を、赤血球を測定の際としない程度に処理し、白血球と異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤からなる水溶液と混合する工程、(2) 染色することによって少なくとも白血球と異常細胞の間に蛍光強度の差異を生じる少なくとも1つの蛍光色素を含む染色液と混合し、染色する工程、(3)

(2) で調製した測定用試料をフローサイトメータで測定し、少なくとも1つの散乱光と、少なくとも1つの蛍光を測定する工程、(4) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて白血球の分布領域を設定し、白血球を分類計数する工程、(5) (3) で測定した散乱光と蛍光の強度差を用いて異常細胞の分布領域を設定し、異常細胞を分類計数する工程、からなる異常細胞分類計数方法を提供する。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/48
// G 0 1 N 33/50

識別記号

F I
G 0 1 N 33/48
33/50

テーマコード(参考)

P
L

- (72)発明者 坂田 孝
神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
シスメックス株式会社内
- (72)発明者 浜口 行雄
神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
シスメックス株式会社内

F ターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA03 DA02 DA05
EA01 EA14 KA02 KA09 LA01
2G045 AA03 AA04 AA07 BA13 BB25
BB29 BB40 CA02 CA03 CA11
CA16 CA22 CA23 CA24 CA25
CB01 FA14 FA37 FB12 GA01
GA02 GA03 GA04 GA10 GC11
GC15
2G054 AA07 AB02 BB08 CA30 CE02
EA03 FA08 GA04 GB02